

10 / 516076

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/06702

23.05.03

29 NOV 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 5月29日

REC'D 18 JUL 2003

出願番号

Application Number:

特願2002-156276

WIPO PCT

[ST.10/C]:

[JP2002-156276]

出願人

Applicant(s):

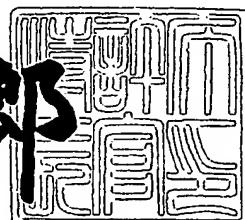
浜松ホトニクス株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月 3日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



Best Available Copy

出証番号 出証特2003-3052526

【書類名】 特許願  
【整理番号】 2002-0230  
【提出日】 平成14年 5月29日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 G01N 21/64  
【発明者】  
【住所又は居所】 静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホトニクス  
株式会社内  
【氏名】 斎藤 晴久  
【発明者】  
【住所又は居所】 静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホトニクス  
株式会社内  
【氏名】 寺田 浩敏  
【特許出願人】  
【識別番号】 000236436  
【氏名又は名称】 浜松ホトニクス株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100088155  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 長谷川 芳樹  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100089978  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 塩田 辰也  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100092657  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 寺崎 史朗

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014708

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光寿命分布画像測定装置およびその測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 パルス励起光を試料に照射し、前記試料から放出される蛍光の寿命の分布を測定する蛍光寿命分布画像測定装置であって、

前記パルス励起光を発するレーザ光源と、

前記レーザ光源の発した前記パルス励起光を前記試料に導いて照射し、前記試料から放出される前記蛍光を導いて出力する測定用光学系と、

前記測定用光学系から出力され到達した前記蛍光の蛍光強度の時間変化を記録するストリーケカメラと、

前記ストリーケカメラで記録された前記蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命を算出し、蛍光寿命分布画像を作成する蛍光寿命分布画像作成手段と、

を備え、

前記測定用光学系は、第1走査手段、光分離手段、第2走査手段、及び、対物光学系を備え、

前記第1走査手段は、前記レーザ光源の発した前記パルス励起光を第1方向に走査して出力し、

前記光分離手段は、前記第1走査手段から到達した前記パルス励起光を前記第2走査手段へ導き、前記第2走査手段から出力され到達した前記蛍光を前記ストリーケカメラに導き、

前記第2走査手段は、前記光分離手段から到達した前記パルス励起光を前記第1方向に垂直な第2方向に走査して出力し、前記対物光学系から出力され到達した前記蛍光を前記第1方向に垂直な第2方向に走査して前記光分離手段へ出力し

前記対物光学系は、前記第1方向及び第2方向、それぞれに走査された前記パルス励起光を集光して前記試料に照射し、前記パルス励起光が照射されたときに前記試料から放出される蛍光を前記第2走査手段へ出力すること、  
を特徴とする蛍光寿命分布画像測定装置。

【請求項2】 前記対物光学系は、前記試料の内部に集光点を合わせる位置

に配置され、

前記パルス励起光は、パルス幅が150 fs以下、前記集光点におけるピークパワー密度が $1 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$ 以上、及び、前記試料が励起され蛍光を発し得る光の最長波長をλとしたときに波長がλ以上2λ以下であること、

を特徴とする請求項1記載の蛍光寿命分布画像測定装置。

【請求項3】 前記パルス励起光は、波長が750 nm以上1000 nm以下であること、

を特徴とする請求項2記載の蛍光寿命分布画像測定装置。

【請求項4】 前記対物光学系は、配置が前記第1方向及び前記第2方向の双方に垂直な方向に沿って移動すること、

を特徴とする請求項2記載の蛍光寿命分布画像測定装置。

【請求項5】 前記第1走査手段及び前記第2走査手段、それぞれガルバノミラーであり、前記光分離手段は、ダイクロイックミラーであること、

を特徴とする請求項1～4のいずれか一項記載の蛍光寿命分布画像測定装置。

【請求項6】 パルス励起光を試料に照射し、前記試料から放出される蛍光の寿命の分布を測定する蛍光寿命分布画像測定方法であって、

パルス幅が150 fs以下、集光点におけるピークパワー密度が $1 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$ 以上、及び、前記試料が励起され蛍光を発し得る光の最長波長をλとしたときに波長がλ以上2λ以下である前記パルス励起光を発する第1ステップと、

前記パルス励起光を第1方向に走査する第2ステップと、

前記第1方向に走査された前記パルス励起光を前記第1方向に垂直な第2方向に走査する第3ステップと、

前記第1方向及び第2方向、それぞれに走査された前記パルス励起光を前記試料の内部に集光させる第4ステップと、

集光された前記パルス励起光の照射により放出される前記蛍光の蛍光強度の時間変化を記録する第5ステップと、

記録された前記蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命を算出し、蛍光寿命分布画像を作成する第6ステップと、

を備えることを特徴とする蛍光寿命分布画像測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、励起光を照射された試料から放出される蛍光の蛍光寿命の分布画像を取得する蛍光寿命分布画像測定装置およびその方法に関するものである。

## 【0002】

## 【従来の技術】

被測定物に励起光を照射すると、その被測定物に含まれる蛍光物質から蛍光が発生する。その蛍光の強度は、励起光照射時刻から時間を経るに従って指数関数的に減衰していく。この蛍光減衰曲線の減衰特性を表すのが蛍光寿命であり、この蛍光寿命は、蛍光物質の種類によって決まっている。

## 【0003】

近年、蛍光タンパク質や蛍光色素で染色した細胞の蛍光寿命値の分布を画像化することにより、細胞内における反応を高精度に測定することができるFLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) と呼ばれる測定方法が提案され、論文「Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) : Instrumentation and Applications」(Critical Reviews in Analytical Chemistry, 23(5) : 369-395(1992)) に記載されている。本測定方法は、例えば、細胞内で遺伝子が発現したかどうかを調べる蛍光タンパク質、カルシウムなどのイオン濃度を測定できる蛍光色素、細胞内での pH を測定できる蛍光色素などの蛍光寿命の変化を測定することにより、遺伝子発現の有無、イオン濃度、pHなどの細胞内での分布を画像化することができるものである。

## 【0004】

このようなFLIM測定法として、PMTによる時間相関計数法とレーザスキャンとの組み合わせによる方法、ゲート・イメージ・インテンシファイアによる時間分解画像計測法、及び、ストリームカメラによる方法が知られている。

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら上記従来例では以下のような問題点がある。PMTによる時間相関

計数法を用いた方法は、励起光の1パルス毎に单一光子しか測定できないので、測定時間が長くかかりすぎるため時々刻々と変化する細胞内の反応を追跡することができないという問題がある。

## 【0006】

ゲート・イメージ・インテンシファイアを用いた方法は、ゲート法により蛍光寿命を測定することから、蛍光の取得効率が悪く、励起レーザの影響で細胞等の生体試料の退色及び試料自体の損傷が発生するという問題点がある。

## 【0007】

一方、ストリークカメラを用いた従来の方法は、時間分解能および感度が高いものの、励起レーザの影響で細胞等の生体試料の退色及び試料自体の損傷が発生するという問題点がある。

## 【0008】

本発明は、上記問題点を解消する為になされたものであり、細胞等の試料へのダメージを最小にするとともに、短時間での測定を実現することができる蛍光寿命分布画像測定装置およびその測定方法を提供することを目的とする。

## 【0009】

## 【課題を解決するための手段】

本発明に係る蛍光寿命分布画像測定装置は、パルス励起光を試料に照射し、試料から放出される蛍光の寿命の分布を測定する蛍光寿命分布画像測定装置であつて、パルス励起光を発するレーザ光源と、レーザ光源の発したパルス励起光を試料に導いて照射し、試料から放出される蛍光を導いて出力する測定用光学系と、測定用光学系から出力され到達した蛍光の蛍光強度の時間変化を記録するストリークカメラと、ストリークカメラで記録された蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命を算出し、蛍光寿命分布画像を作成する蛍光寿命分布画像作成手段と、を備え、測定用光学系は、第1走査手段、光分離手段、第2走査手段、及び、対物光学系を備え、第1走査手段は、レーザ光源の発したパルス励起光を第1方向に走査して出力し、光分離手段は、第1走査手段から到達したパルス励起光を第2走査手段へ導き、第2走査手段から出力され到達した蛍光をストリークカメラに導き、第2走査手段は、光分離手段から到達したパルス励起光を第1方向に垂直

な第2方向に走査して出力し、対物光学系から出力され到達した蛍光を第1方向に垂直な第2方向に走査して光分離手段へ出力する。対物光学系は、第1走査手段、第2走査手段と共に位置関係にあり、第1方向及び第2方向、それぞれに走査されたパルス励起光を集光して試料に照射し、パルス励起光が照射されたときに試料から放出される蛍光を第2走査手段へ出力すること、を特徴とする。

## 【0010】

本発明に係る蛍光寿命分布画像測定装置によれば、レーザ光源より発せられたパルス励起光は、測定用光学系に出力され、測定用光学系に出力されたパルス励起光は、第1走査手段により第1方向に走査されて出力され、第1方向に走査されて出力されたパルス励起光は、第2走査手段により第1方向に垂直な第2方向に走査して出力され、第2方向に走査して出力されたパルス励起光は、対物光学系により集光されて試料に照射される。パルス励起光が試料に照射されたときに試料から放出される蛍光は、対物光学系により第2走査手段へ出力され、第2走査手段へ出力された蛍光は、第2走査手段により第1方向に垂直な第2方向に走査して光分離手段へ出力される。ここで、パルス励起光と蛍光とが第2走査手段を往復通過する事で、蛍光は、ストリークカメラ上で第2走査方向には走査されず第1走査方向にのみ走査される。光分離手段へ出力された蛍光は、光分離手段によりストリークカメラへ出力され、ストリークカメラへ出力された蛍光は、ストリークカメラにより蛍光の蛍光強度の時間変化として記録される。そして、ストリークカメラで記録された蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命が算出され、蛍光寿命分布画像が作成される。

## 【0011】

本発明に係る蛍光寿命分布画像測定装置は、対物光学系が試料の内部に集光点を合わせる位置に配置され、パルス励起光のパルス幅が150 fs以下、パルス励起光の集光点におけるピークパワー密度が $1 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$ 以上、及び、試料が励起され蛍光を発し得る光の最長波長を $\lambda$ としたときにパルス励起光の波長が $\lambda$ 以上 $2\lambda$ 以下であることが好ましい。このようにすれば、パルス励起光により集光点において二光子励起を起こすことができる。

## 【0012】

本発明に係る蛍光寿命分布画像測定装置は、パルス励起光の波長が750nm以上1000nm以下であるのが好ましい。このようにすれば、蛍光タンパク質や蛍光色素で染色した細胞等の試料において二光子励起を起こすことができる。

## 【0013】

本発明に係る蛍光寿命分布画像測定装置は、対物光学系の配置が第1方向及び第2方向の双方に垂直な方向に沿って移動するのが好ましい。このようにすれば、試料の深さ方向に対しても蛍光寿命を測定することができるため、3次元的な蛍光寿命分布画像を得る事ができる。

## 【0014】

本発明に係る蛍光寿命分布画像測定装置は、第1走査手段及び第2走査手段それぞれがガルバノミラーであり、光分離手段がダイクロイックミラーであるのが好ましい。

## 【0015】

本発明に係る蛍光寿命分布画像測定方法は、パルス励起光を試料に照射し、試料から放出される蛍光の寿命の分布を測定する蛍光寿命分布画像測定方法であって、パルス幅が150fs以下、集光点におけるピークパワー密度が $1 \times 10^5 W/cm^2$ 以上、及び、試料が励起され蛍光を発し得る光の最長波長をλとしたときに波長がλ以上 $2\lambda$ 以下であるパルス励起光を発する第1ステップと、パルス励起光を第1方向に走査する第2ステップと、第1方向に走査されたパルス励起光を第1方向に垂直な第2方向に走査する第3ステップと、第1方向及び第2方向、それに走査されたパルス励起光を試料の内部に集光させる第4ステップと、集光されたパルス励起光の照射により放出される蛍光の蛍光強度の時間変化を記録する第5ステップと、記録された蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命を算出し、蛍光寿命分布画像を作成する第6ステップと、を備えることを特徴とする。

## 【0016】

本発明に係る蛍光寿命分布画像測定方法によれば、第1ステップで発せられたパルス幅が150fs以下、集光点におけるピークパワー密度が $1 \times 10^5 W/cm^2$ 以上、及び、試料が励起され蛍光を発し得る光の最長波長をλとしたときに

波長が $\lambda$ 以上 $2\lambda$ 以下であるパルス励起光は、第2ステップで第1方向に走査される。第1方向に走査されたパルス励起光は、第3ステップで第1方向に垂直な第2方向に走査される。第1方向及び第2方向、それぞれに走査されたパルス励起光は第4ステップで試料の内部に集光され、集光されたパルス励起光の照射により放出される蛍光の蛍光強度の時間変化が第5ステップで記録される。記録された蛍光強度の時間変化に基づいて第6ステップで蛍光寿命が算出され、蛍光寿命分布画像が作成される。

## 【0017】

## 【発明の実施の形態】

以下、添付図面を参照して本発明の実施の形態を詳細に説明する。なお、図面の説明において同一の要素には同一の符号を付し、重複する説明を省略する。

## 【0018】

本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定装置は、二光子励起により試料を励起させている。二光子励起はレーザ光の強度を非常に大きくした場合に発生する現象である。まず、二光子励起について簡単に説明する。

## 【0019】

試料 $50$ の吸収のバンドギャップ $E_G$ よりも光子のエネルギー $h\nu$ が小さいと試料を励起することが出来ない。よって、試料 $50$ に吸収が生じる条件は $h\nu > E_G$ である。しかし、パルス励起光の強度を非常に大きくすると $n h\nu > E_G$ の条件( $n = 2, 3, 4, \dots$ である)で試料 $50$ が励起される。この現象を多光子励起とい、 $n = 2$ の場合を二光子励起という。パルス波の場合、レーザ光の強度はレーザ光の集光点のピークパワー密度( $W/cm^2$ )で決まり、例えばピークパワー密度が $1 \times 10^5 (W/cm^2)$ 以上の条件で多光子吸収が生じる。ピークパワー密度は、(集光点におけるレーザ光の1パルス当たりのエネルギー) ÷ (レーザ光のビームスポット断面積×パルス幅)により求められる。

## 【0020】

二光子励起は、一光子励起のときよりも、エネルギーが低い長波長のレーザを使用することができる。長波長のレーザを使用できることの長所としては、細胞などの試料のダメージが小さいことと、組織内の深部までレーザが届くため、試

料の比較的深い領域も観察できることが挙げられる。また、二光子励起は、二個の光子がほぼ同時に来た場合に起こるため、光強度のほぼ2乗に比例して発生すると言われ、レーザの集光点だけで蛍光分子が励起される。したがって、集光点ではない観察しない部分の蛍光退色を防ぐことができ、長時間の観察や組織等の試料の広い範囲で観察することも可能となる。なお、集光点とはレーザ光が集光した箇所のことである。

## 【0021】

上記の理由から細胞等の生体試料の蛍光寿命を測定するには、二光子励起が必須である。そのため発明者は、ストリークカメラを用いたスリット光蛍光寿命分布画像計測装置を試作し、スリット光により二光子励起を起こす方法を試みた。しかし、スリット光では、二光子励起の励起効率の低さから蛍光寿命データの取得に至らなかた。そこで、発明者は、さらに開発に努め本願発明を完成するに至った。

## 【0022】

図1は本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定装置1の概略構成を示す構成図である。

## 【0023】

本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定装置1は、蛍光分子を含む試料50にパルス励起光を照射し、この試料50から放出される蛍光の寿命を測定するものである。この蛍光寿命分布画像測定測定装置1は、レーザ光源10、測定用光学系20、ストリークカメラ30、及び、蛍光寿命分布画像作成手段40を備えている。

## 【0024】

レーザ光源10は、試料50に対して照射すべきパルス励起光を繰り返し出力するものであり、例えば、チタンサファイアレーザ等の超短光パルス（フェムト秒パルス）レーザ光源が好適に用いられる。

## 【0025】

レーザ光源10の側方に設けられる測定用光学系20は、レーザ光源10の発したパルス励起光を試料50に導いて照射し、試料50から放出される蛍光を導

いてストリームカメラへ出力するものであり、第1走査手段100、光分離手段110、第2走査手段120、励起光光学系130、対物光学系140、瞳リレー光学系150、及び、結像光学系160を有している。

## 【0026】

レーザ光源10の側方に設けられる第1走査手段100は、第1スキャナドライバ101により駆動され、レーザ光源10より発せられたパルス励起光を第1方向(X軸方向)に走査して瞳リレー光学系150へ出力するものであり、例えば、ガルバノミラー等が好適に用いられる。

## 【0027】

第1走査手段100の側方に設けられる瞳リレー光学系150は、第1走査手段100と第2走査手段120とが共役の関係になるように配置され、第1走査手段100から到達したパルス励起光を光分離手段110を介して第2走査手段120へ導くものである。

## 【0028】

瞳リレー光学系150の側方に設けられる光分離手段110は、瞳リレー光学系150から到達したパルス励起光を反射して第2走査手段120へ出力し、第2走査手段120から到達した蛍光を透過して結像光学系160へ出力するものであり、例えば、ダイクロイックミラー等が好適に用いられる。

## 【0029】

光分離手段110の側方に設けられている第2走査手段120は、第2スキャナドライバ121により駆動され、光分離手段110から到達したパルス励起光を第1方向(以下「X軸方向」という)に垂直な第2方向(以下「Y軸方向」という)に走査して励起光光学系130へ出力し、励起光光学系130から到達した蛍光をX軸方向に垂直なY軸方向に走査して光分離手段110へ出力するものであり、例えば、ガルバノミラー等が好適に用いられる。

## 【0030】

第2走査手段120の下方に位置する励起光光学系130は、第2走査手段120と対物光学系140とが共役の関係になるように配置され、第2走査手段120から到達したパルス励起光を対物光学系140へ出力し、対物光学系140

から到達した蛍光を第2走査手段120へ出力するものである。

## 【0031】

励起光光学系130の下方に位置する対物光学系140は、励起光光学系130から到達したパルス励起光を集光して試料50に照射し、パルス励起光が試料50に照射されたときに試料50から放出される蛍光を励起光光学系130へ出力するものである。

## 【0032】

光分離手段110の側方に設けられている結像光学系160は、試料50とストリーカメラ30の光電面とが共役の関係になるように配置され、光分離手段110から到達した蛍光をストリーカメラ30の光電面上に結像するものである。

## 【0033】

結像光学系160の側方に設けられているストリーカメラ30は、測定用光学系20から出力された蛍光の蛍光強度の時間変化を記録するものであり、高速スキャン型CCD31は、ストリーカメラ30の蛍光面上の光像を撮像するものである。

## 【0034】

蛍光寿命分布画像作成手段40は、ストリーカメラ30で記録された蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命を算出し、蛍光寿命分布画像を作成するものである。

## 【0035】

本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定装置1の動作について説明するとともに、蛍光寿命分布測定方法についても説明する。

## 【0036】

本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定装置1によれば、レーザ光源10より発せられたパルス励起光は、測定用光学系20に出力され、測定用光学系20に出力されたパルス励起光は、第1走査手段100によりX軸方向に走査されて出力され、X軸方向に走査されて出力されたパルス励起光は、瞳リレー光学系150により光分離手段110へ出力され、光分離手段110へ出力されたパルス励

起光は、第2走査手段120によりX軸方向に垂直なY軸方向に走査して出力され、Y軸方向に走査して出力されたパルス励起光は、対物光学系140により集光されて試料50に照射される。パルス励起光が試料50に照射されたときに試料50から放出される蛍光は、対物光学系140により励起光光学系130へ出力され、励起光光学系130へ出力された蛍光は、励起光光学系130により第2走査手段120へ出力され、第2走査手段120へ出力された蛍光は、第2走査手段120によりX軸方向に垂直なY軸方向に走査して光分離手段110へ出力され、光分離手段110へ出力された蛍光は、光分離手段110により結像光学系160へ出力され、結像光学系160へ出力された蛍光は、結像光学系160によりストリークカメラ30へ出力され、ストリークカメラ30へ出力された蛍光は、ストリークカメラ30により蛍光の蛍光強度の時間変化として記録される。そして、ストリークカメラ30で記録された蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命が算出され、蛍光寿命分布画像が作成される。

#### 【0037】

また、本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定方法によれば、第1ステップで発せられたパルス幅が150 fs以下、集光点におけるピークパワー密度が $1 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$ 以上、及び、試料50が励起され蛍光を発し得る光の最長波長を $\lambda$ としたときに波長が $\lambda$ 以上 $2\lambda$ 以下であるパルス励起光は、第2ステップでX軸方向に走査される。X軸方向に走査されたパルス励起光は、第3ステップでX軸方向に垂直なY軸方向に走査される。X軸方向及びY軸方向、それぞれに走査されたパルス励起光は第4ステップで試料の内部に集光され、集光されたパルス励起光の照射により放出される蛍光の蛍光強度の時間変化が第5ステップで記録される。記録された蛍光強度の時間変化に基づいて第6ステップで蛍光寿命が算出され、蛍光寿命分布画像が作成される。

#### 【0038】

図2は、顕微鏡の対物光学系140下における細胞等の試料50に対する走査状態を示す。本図は、スポット状のパルス励起光を、試料50のX軸方向に高速に走査(1, 2, 3, ..., M)しながら、さらにY軸方向にも走査(1, 2, 3, ..., N)したものを模式的に示したものである。X軸方向の走査距離

は、ストリーカメラ30の光電面のスリット長に対応している。また、X軸方向の走査周期は100Hz～1kHzに設定されている。

## 【0039】

パルス励起光の周波数は約1MHz～80MHzであり、X軸走査手段20は100Hz～1kHzで走査するため、パルス励起光が集光された直径約0.5μmの光球がX軸方向に走査されることにより擬似スリット状に並ぶ。

## 【0040】

ここで、Y軸方向の走査では、第2走査手段120（ガルバノミラー）が、光分離手段110（ダイクロイックミラー）より後方に配置され、第2走査手段120（ガルバノミラー）は、励起光光学系130（瞳投影レンズ）の後側焦点面に位置し、Y軸方向にのみパルス励起光を走査する。試料から発生する蛍光はこの第2走査手段を通過しディスキヤンされストリーカメラ30へ向かう。すなわち、励起光光学系130（瞳投影レンズ）上のY軸方向に振られた像は、X軸方向にのみ走査された形となり、必ずストリーカメラ30の光電面に結像する事になる。

## 【0041】

蛍光は、ストリーカメラ30のスリットを介して結像光学系160により、ストリーカ管の光電面上にスリット像として結像される。蛍光がスリットに入射し、光電面に達したとすると、この蛍光は、光電面によりその光の強度に応じた数の電子に変換され、加速電極により加速されて蛍光面に向かって飛び出して行く。この電子が掃引電極の間を通過する時、タイミングを合わせて掃引電極に印加された高電圧により、高速掃引が行われる。これにより、少しずつ遅れてやってきた電子群は垂直方向の少しずつ異なった角度に変更され、MCP(マイクロチャネルプレート)に飛び込む。電子群はMCPを通過する際、数万倍まで電子の数を増倍された後、蛍光面に衝突し、光に変換される。蛍光面では、最も早く入射した光パルスに対応する蛍光像が最も上方に位置し、順に下方へと配列される。つまり、蛍光面上の垂直方向が時間軸になる。また、蛍光像の明るさは、それぞれの蛍光の強度に比例している。さらに、蛍光像の水平方向の位置は、蛍光の水平方向の位置に対応している。蛍光面上の増幅されたストリーカ像は、高速スキャン

型CCD31により撮像される。ここで、高速スキャン型CCD31は、ストリーケ掃引回路からのCCDトリガ信号を受信したCCDカメラ駆動回路からの指令信号により露光を開始する。

## 【0042】

図6は本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定装置1の動作タイミングを示す図である。ここで、レーザ光源10の発するパルス励起光の周期とストリーケカメラ30の掃引周期とは同期している。従って、パルス励起光の照射によって試料50から放出された蛍光ごとにストリーケ像が取得され、高速スキャン型CCD31により撮像される。

## 【0043】

また、図6に示されるように、高速スキャン型CCD31の露光時間とY軸の掃引タイミングとは同期している。高速スキャン型CCD31の露光時間は約200msであり、この間第2走査手段120は停止している。約200ms経過し、CCD画像1枚分の撮像が終了すると、第2走査手段120（ガルバノミラー）を動かし次の画像の撮像を行う。

## 【0044】

これをN回繰り返すことによって図2に示すように、試料50に対する2次元的な走査が行われる。

## 【0045】

図3は、本実施形態に係るストリーケカメラ30により記録された蛍光のストリーケ像を高速スキャン型CCD31で撮像した画像を示す図である。それぞれの画像は、高速スキャン型CCD31の露光時間の間第2走査手段120を固定しておき、高速スキャン型CCD31をその間露光させて取得したものである。X軸方向に走査(1, 2, 3, ..., M)されたパルス励起光により励起され放出された蛍光の強度に対応したストリーケ像が取得されている。ここで画像の水平方向がX軸方向に対応し、画像の垂直方向が時間軸となる。よって図4に示すように、走査点1~Mそれぞれに対応した縦のラインごとに、それぞれの走査点における蛍光強度の時間変化データが取得できる。ここで、Y軸の走査をN回行った場合には、N枚の画像が取得される。

## 【0046】

図5は、本実施形態に係る蛍光寿命プロファイルを示す図である。蛍光の強度がピーク値の $1/e$ に減衰するまでの時間を蛍光寿命値とする。蛍光寿命分布画像作成手段40では、高速スキャン型CCD31で取得した蛍光強度の時間変化データに基づき、それぞれの縦のラインごとに、1～Mまでの各集光点に対応した試料50の蛍光寿命値を算出する。

## 【0047】

蛍光寿命を算出するには、CCDの縦の1ラインごとに得られた蛍光強度の時間変化データに対して、時間変化を所定の曲線（関数系）等でフィッティングするフィッティング計算を行って、蛍光の蛍光寿命を算出する。この処理を1枚の画像においてMライン分行い、さらに同様の処理をN枚の画像それぞれについて行うことにより、各走査点における蛍光寿命の寿命値のデータが得られる。

## 【0048】

以上のようにして得られた各走査点における蛍光寿命の寿命値を、寿命値の长短に応じた色彩により各走査点ごとに表示することによって、細胞等の試料50の蛍光寿命分布画像（FLIM画像）を取得することができる。

## 【0049】

なお、蛍光寿命分布画像作成手段40には、必要に応じて、蛍光寿命分布画像作成手段40で得られた蛍光寿命分布画像を表示するための表示装置41（図1参照）を接続しておくことが好ましい。

## 【0050】

本実施形態に係る対物光学系140は、試料50の内部に集光点を合わせる位置に配置され、パルス励起光は、パルス幅が150fs以下、集光点におけるピークパワー密度が $1 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$ 以上、及び、試料50が励起され蛍光を発し得る光の最長波長を $\lambda$ としたときに波長が $\lambda$ 以上 $2\lambda$ 以下であるのが好適である。この場合は、パルス励起光により集光点において二光子励起を起こす事ができる。

## 【0051】

また、パルス励起光は、波長が750nm以上1000nm以下であるのが好

適である。このようにすれば、蛍光タンパク質や蛍光色素で染色した細胞等の試料において二光子励起を起こすことができる。

#### 【0052】

本実施例において、レーザ光源10には、パルス幅150 fs以下、周波数76 MHzのチタンサファイアレーザを使用した。また、対物光学系140には、40倍の油浸または水浸の対物レンズを使用した。この場合レーザの出力は約8 mWである。また、周波数1 MHzのレーザ光源10を使用した場合には、レーザ出力は、0.1 mWとなる。

#### 【0053】

本実施形態に係る対物光学系140は、配置がX軸方向及びY軸方向の双方に垂直な方向に沿って移動するのが好適である。この場合は、試料50の深さ方向に対しても蛍光寿命を測定することができるため、3次元の蛍光寿命分布画像を得る事ができる。

#### 【0054】

長波長レーザは、短波長のレーザより組織内の深部までレーザが届くため、試料の比較的深い領域も観察できる。また、一光子励起では集光点の前後でも励起されるため、深さ方向の空間分解能は取れないが、二光子励起は直径約0.5 μmのパルス励起光の集光点でのみ励起が起こるので、空間分解能にすぐれる。よって、対物光学系140を動かして集光点を試料80の深さ方向に移動させることにより、深さ方向のマッピングができる。これによって、3次元の蛍光寿命分布画像を得る事ができる。

#### 【0055】

##### 【発明の効果】

以上、詳細に説明したとおり、本発明によれば、細胞等の試料へのダメージを最小にするとともに、短時間での計測を実現することができる蛍光寿命分布画像計測装置およびその計測方法を提供することができる。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定装置の構成図である。

【図2】

本実施形態に係る顕微鏡下における試料のスキャン状態を示す図である。

【図3】

本実施形態に係るストリーカメラにより記録された蛍光のストリーカ像を高速スキャン型CCDで撮像した画像を示す図である。

【図4】

各走査点における蛍光強度の時間変化を示す図である。

【図5】

蛍光寿命プロファイルを示す図である。

【図6】

本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定装置の動作タイミングを示す図である

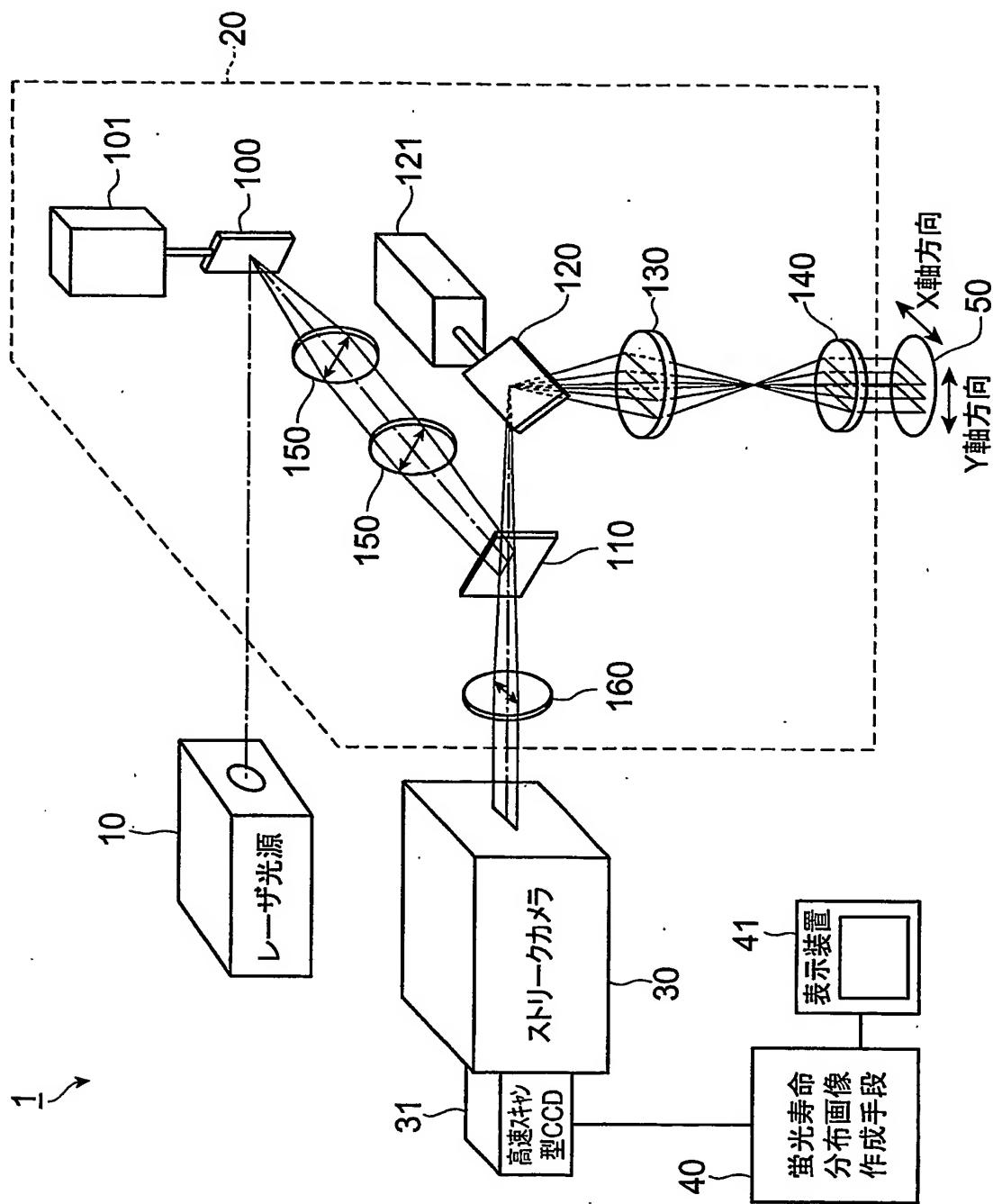
【符号の説明】

1…蛍光寿命分布画像測定装置、10…レーザ光源、20…測定用光学系、30…ストリーカメラ、31…高速スキャン型CCD、40…蛍光寿命分布画像作成手段、50…試料、100…第1走査手段、101…第1スキャナドライバ、110…光分離手段、120…第2走査手段、121…第2スキャナドライバ、130…励起光光学系、140…対物光学系。

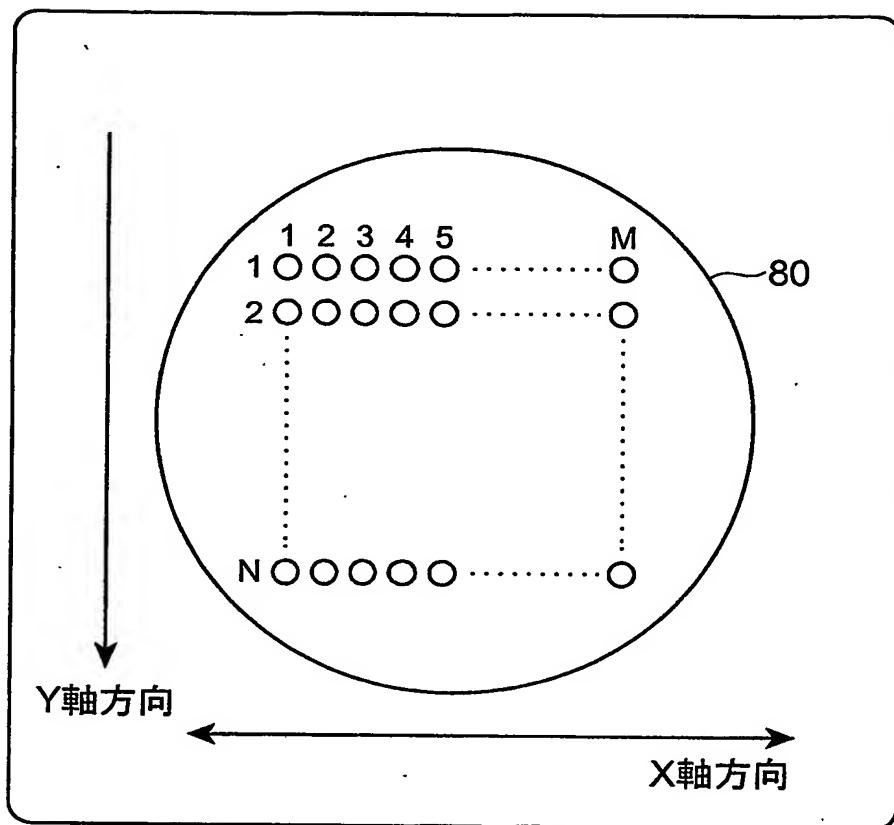
【書類名】

図面

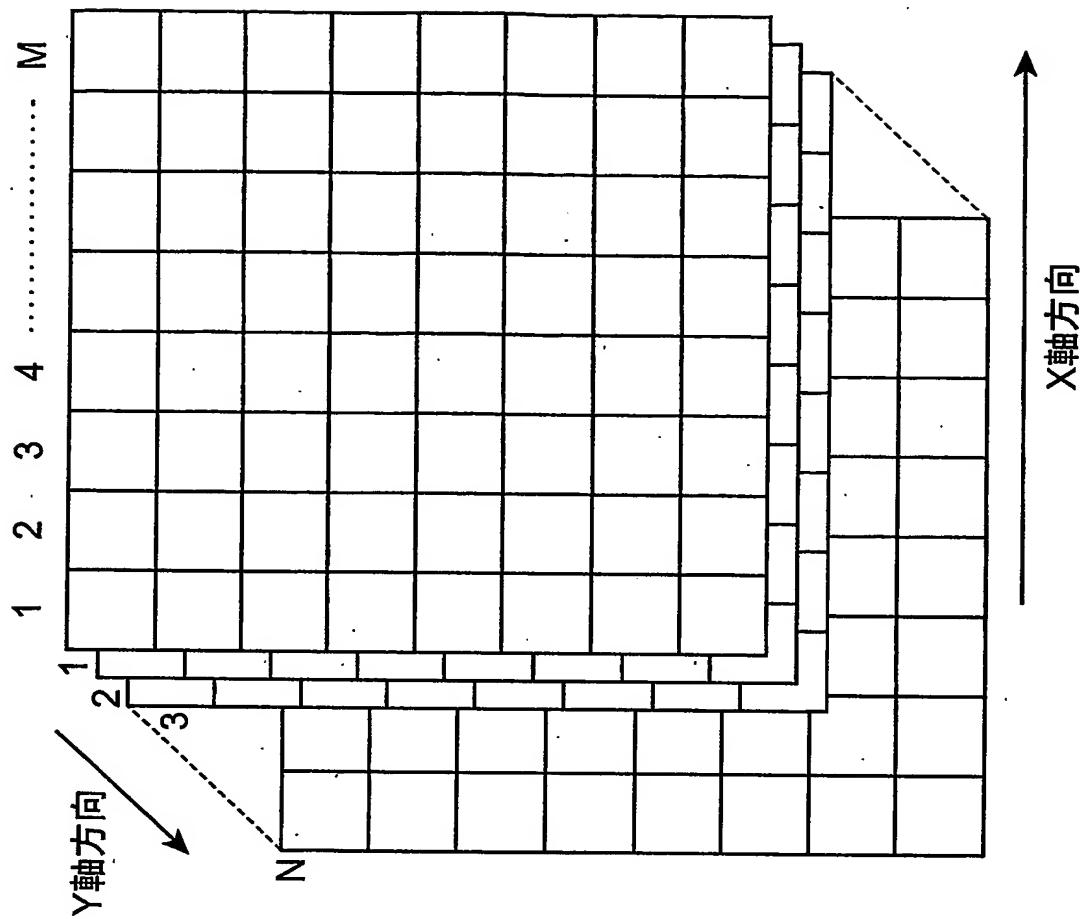
【図1】



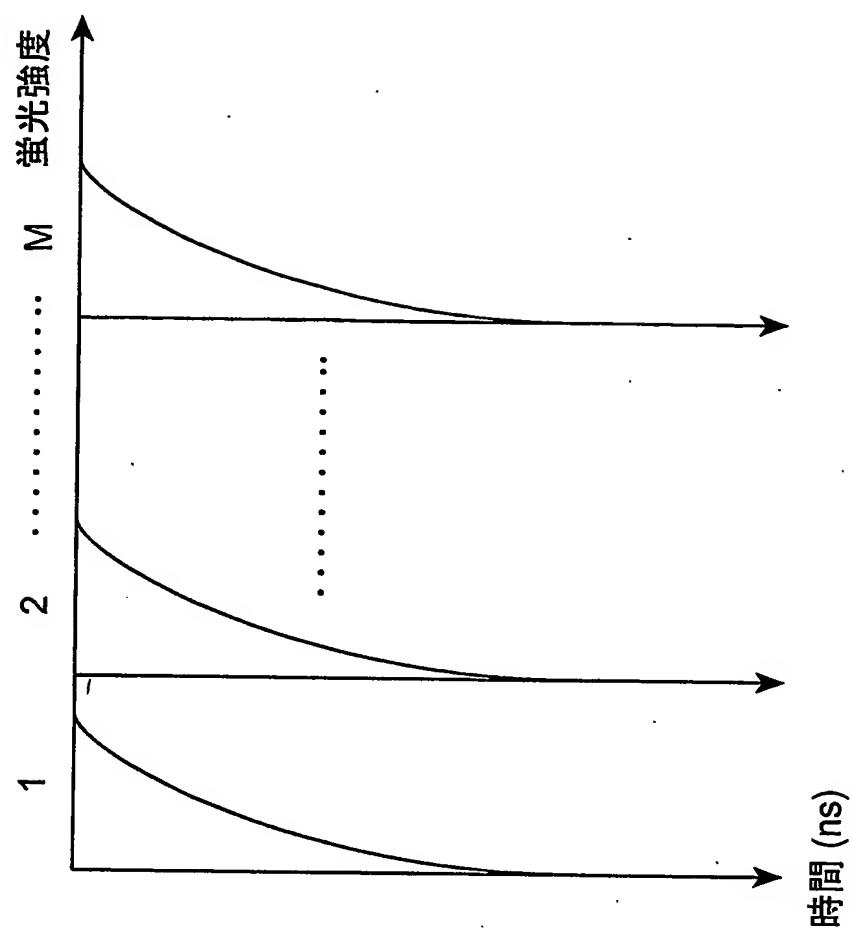
【図2】



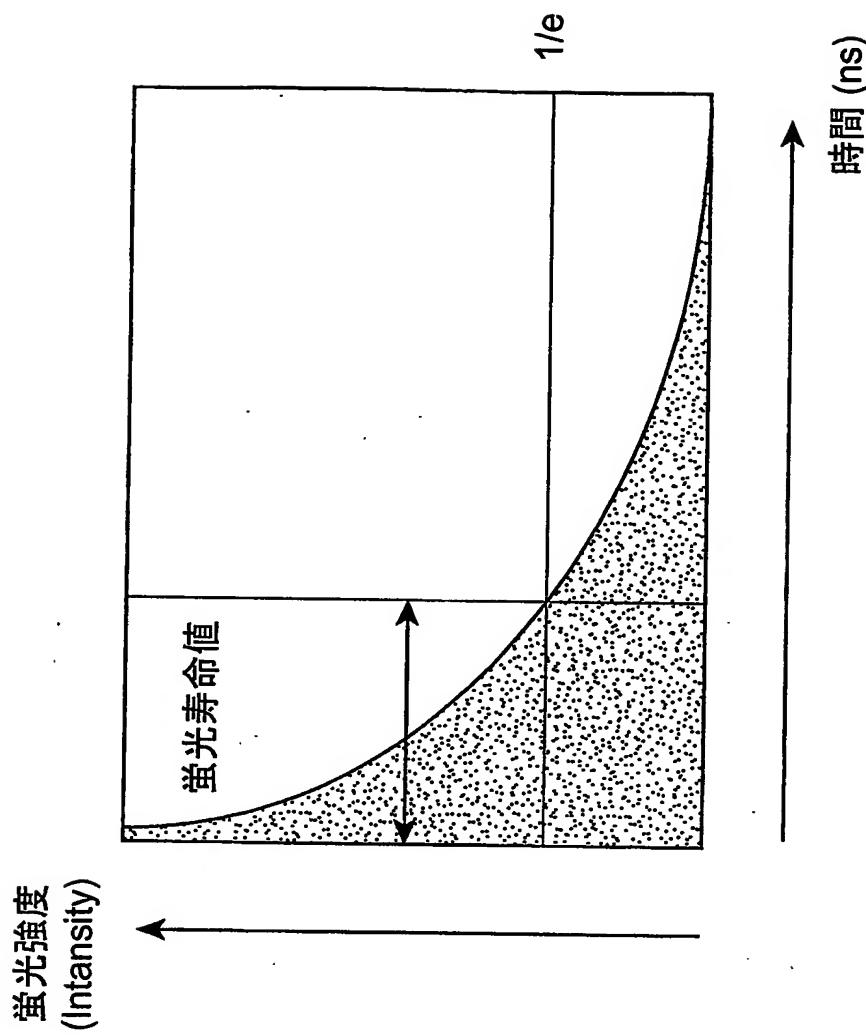
【図3】



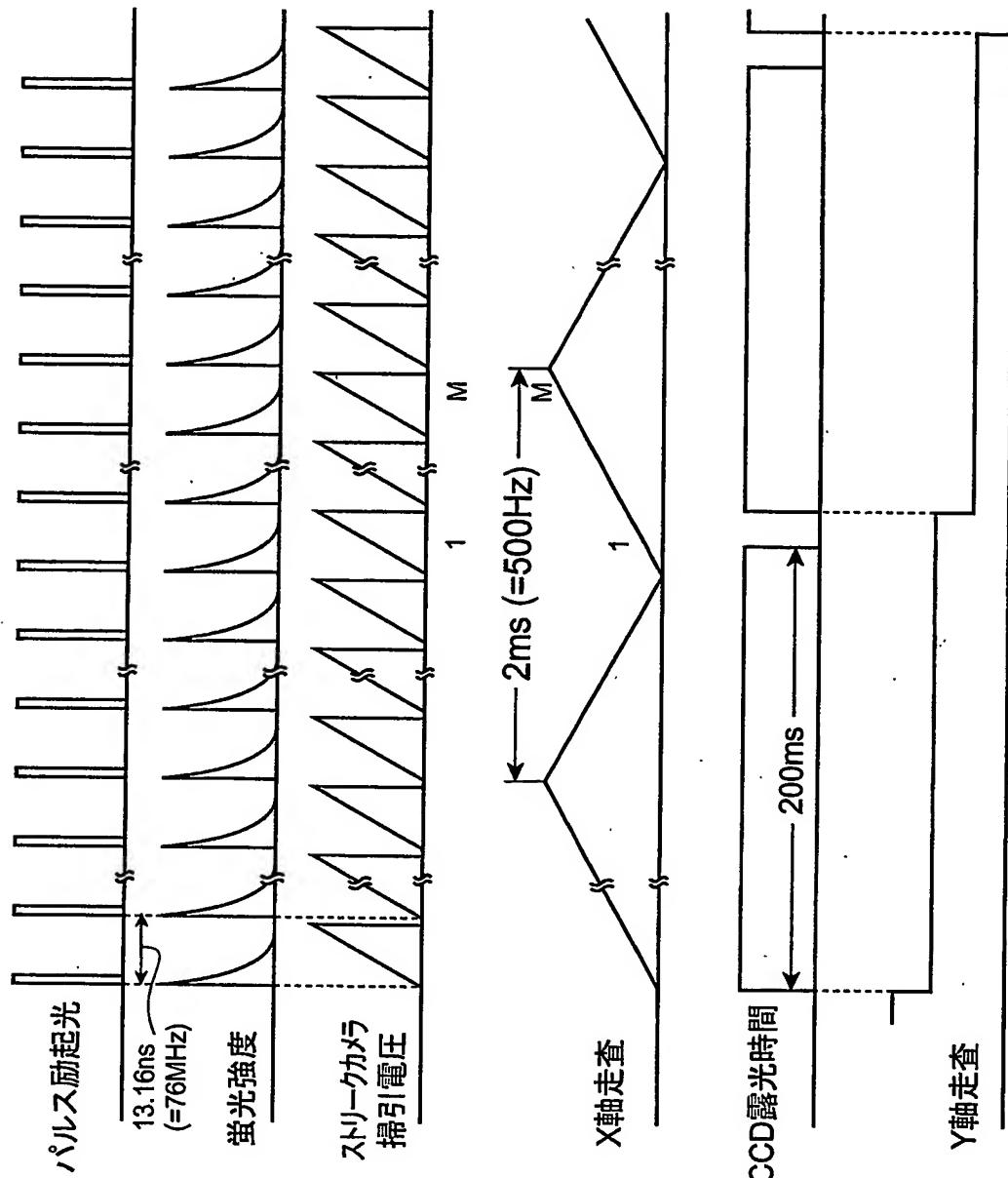
【図4】



【図5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞等の試料へのダメージを最小にするとともに、短時間での測定を実現することができる蛍光寿命分布画像測定装置を提供する。

【解決手段】 レーザ光源10より発せられたパルス励起光は、第1走査手段100により第1方向に走査され、第2走査手段120により第1方向に垂直な第2方向に走査され、対物光学系140により集光されて試料50に照射される。試料50から放出される蛍光は、対物光学系140により第2走査手段120へ出力され、第2走査手段120により第1方向に垂直な第2方向に走査して光分離手段110へ出力され、光分離手段110からストリークカメラへ出力され、ストリークカメラ30により蛍光強度の時間変化として記録される。この蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命が算出され、蛍光寿命分布画像が作成される。

【選択図】 図1

出願人履歴情報

識別番号 [000236436]

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 静岡県浜松市市野町1126番地の1

氏 名 浜松ホトニクス株式会社